

# 广谱抗稻瘟病种质 75-1-127 的褐飞虱抗性基因鉴定及分子标记辅助选择育种

降好宇<sup>#</sup> 曾盖<sup>#</sup> 郝明 黄湘桂 肖应辉<sup>\*</sup>

(湖南农业大学 农学院/水稻油菜抗病育种湖南省重点实验室/南方粮油作物协同创新中心, 长沙 410128; <sup>#</sup>共同第一作者; <sup>\*</sup>通讯联系人, E-mail: xiaoyh@hunau.edu.cn)

## Identification of Brown Planthopper Resistance Genes in Broad-spectrum Blast Resistant Rice Germplasm 75-1-127 and Its Molecular Marker-Assisted Selection Breeding

JIANG Haoyu<sup>#</sup>, ZENG Gai<sup>#</sup>, HAO Ming, HUANG Xianggui, XIAO Yinghui<sup>\*</sup>

(Agronomy College, Hunan Agricultural University / Hunan Provincial Key Laboratory of Rice and Rapeseed Breeding for Disease Resistance / Southern Regional Collaborative Innovation Center for Grain and Oil Crops in China, Changsha 410128, China; <sup>#</sup>These authors contributed equally to this work; <sup>\*</sup>Corresponding author, E-mail: xiaoyh@hunau.edu.cn)

**Abstract:** 【Objective】Rice line, 75-1-127, which harbors the broad-spectrum blast resistance gene *Pi9*, has been widely used in rice variety improvement for blast resistance. Given that 75-1-127 shows strong resistance to brown planthoppers in our previous breeding projects, we identified its resistance genes to brown planthoppers and used it in molecular marker-assisted selection breeding. 【Method】The PCR products, which amplified from the genomic DNA of 75-1-127 with the primers designed according to the sequence of *Bph14* and *Bph15* genes in rice line B5, were sequenced and analyzed. The brown planthopper resistance of 75-1-127 and B5 were also identified with seedling bulk test method. A series of two-line genic male sterile lines derived from backcross with 75-1-127 as a donor parent, were screened with the molecular markers linked to *Bph14* and *Bph15* genes. The blast resistance, brown planthopper resistance and main agronomic traits of these progenies were also identified and evaluated. 【Result】The sequences of *Bph14* and *Bph15* in 75-1-127 were identical with those in B5. The resistance scores at seedling stage of 75-1-127 and B5 were both grade 1. In the progenies with 75-1-127 as resistance resource, the resistances to brown planthoppers of those monogenic lines of *Bph14* or *Bph15* and those *Bph14/Bph15* pyramiding lines were all improved. That the seedling mortality of *Bph14/Bph15* pyramiding lines was 8.5%, equivalent to the donor parents 75-1-127 and the positive control B5, further confirming that 75-1-127 contained resistance genes to brown planthoppers. 【Conclusion】Rice line 75-1-127, which carries the genes of *Bph14* and *Bph15*, could be used as resistance resource in breeding.

**Key words:** rice; brown planthopper resistance; *Bph14*; *Bph15*; molecular marker-assisted selection breeding

**摘要:** 【目的】水稻品系 75-1-127 携带广谱抗稻瘟病基因 *Pi9*, 已被广泛应用于抗稻瘟病水稻品种改良。笔者育种实践发现 75-1-127 表现出较强的褐飞虱抗性, 因此鉴定该品系中的褐飞虱抗性基因并进行分子辅助选择育种。

【方法】根据水稻品系 B5 中褐飞虱抗性基因 *Bph14* 和 *Bph15* 的序列, 设计引物扩增 75-1-127 的基因组 DNA, 并对 PCR 产物进行测序分析。采用苗期集团法鉴定了 75-1-127 和 B5 的褐飞虱抗性表型。利用与 *Bph14* 与 *Bph15* 连锁的分子标记筛查了 75-1-127 为稻瘟病抗源回交转育的两系不育系后代, 并鉴定了这些后代的稻瘟病抗性、褐飞虱抗性和主要农艺性状。【结果】75-1-127 中含有与 B5 完全一致的 *Bph14* 和 *Bph15* 序列。75-1-127 和 B5 苗期褐飞虱抗性均为 1 级。在以 75-1-127 为抗源改良的两系不育系中, 携带 *Bph14*、*Bph15* 的单基因系或双基因系的褐飞虱抗性均得以改良, 其中双基因聚合系的死苗率为 8.5%, 与供体亲本 75-1-127 以及阳性对照 B5 差异不显著, 进一步证实 75-1-127 含有褐飞虱抗性基因。【结论】水稻品系 75-1-127 携带褐飞虱抗性基因 *Bph14* 和 *Bph15*, 可以作为抗源应用于水稻褐飞虱抗性育种。

**关键词:** 水稻; 褐飞虱抗性; *Bph14*; *Bph15*; 分子标记辅助育种

中图分类号: S511.03; Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2019)03-0227-08

收稿日期: 2019-01-08; 修改稿收到日期: 2019-02-18。

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2016YFD0101100); 湖南省科技重大专项(2015NK1001-1); 湖南省研究生科研创新项目(CX2015B255)。

褐飞虱是单食性刺吸式害虫,吸食维管束内汁液造成植物萎蔫、死亡,同时传播草状矮病和齿叶矮缩病等病毒诱发水稻病害,是我国南方稻区的主要害虫之一<sup>[1]</sup>。褐飞虱平均每年为害我国水稻面积约2.467亿 hm<sup>2</sup>,年均损失稻谷1.12亿 kg<sup>[2]</sup>,而且其繁殖力强、生长周期短和远距离迁飞特性,我国南方稻区褐飞虱危害呈逐年加剧趋势。施用化学农药是防治稻飞虱的最常用手段,然而化学防治增加生产成本,加剧环境污染,杀伤害虫的天敌,尤其是长期施用造成稻飞虱种群抗药性不断增强,不利于稻作可持续发展<sup>[3]</sup>。水稻在与褐飞虱共进化的过程中,形成了多种有效的抗性机制<sup>[1]</sup>,其中利用抗性基因培育抗性品种是抵御和防治褐飞虱危害最有效的途径<sup>[4]</sup>。

Pathak等<sup>[5]</sup>报道水稻中存在抗褐飞虱基因,自此各国相继开展了水稻褐飞虱抗性基因的发掘工作。迄今,从栽培稻和野生稻挖掘的水稻抗褐飞虱主效基因至少有31个<sup>[4,6-10]</sup>,除**bph5**、**bph8**以外的29个抗性基因均已定位<sup>[11-12]</sup>。其中,**Bph14**<sup>[13]</sup>、**Bph3**<sup>[14]</sup>、**Bph15**<sup>[15]</sup>、**Bph26/2**<sup>[16]</sup>、**bph29**<sup>[10]</sup>、**Bph18**<sup>[17]</sup>、**Bph9/1/7/10/21**<sup>[18]</sup>和**Bph32**<sup>[19]</sup>等13个褐飞虱抗性基因已成功克隆,为通过分子标记辅助选择和转基因技术培育抗虫新品种提供了优异的抗性资源。

**Bph14**和**Bph15**是武汉大学从药用野生稻衍生的水稻品系B5中鉴定的2个显性主效抗褐飞虱基因,对褐飞虱生物型1、2型具有高抗性<sup>[1]</sup>。**Bph14**是水稻中克隆的抗褐飞虱基因,编码由1323个氨基酸组成的NBS-LRR家族蛋白,该基因通过抗生作用发挥抗褐飞虱功能<sup>[13]</sup>。**Bph15**编码一种凝集素类受体蛋白激酶,通过与OsADF互作调控防卫基因的表达,进而抵御褐飞虱的危害<sup>[20]</sup>。利用杂交、连续回交及分子标记辅助技术将**Bph14**和**Bph15**基因导入杂交稻恢复系,发现恢复系及其配制的杂交组合的褐飞虱抗性均得到显著改良<sup>[21-23]</sup>;将**Bph14**和**Bph15**基因渗入粳稻品种或者两系不育系遗传背景,均有显著增强褐飞虱抗性的效果<sup>[24-26]</sup>。

**Pi9**是从四倍体小粒野生稻与栽培稻远缘杂交、回交构建的渗入系75-1-127中克隆的第一个水稻广谱抗稻瘟病基因,对来自13个国家的43个稻瘟病菌株均表现出很高的抗性<sup>[27]</sup>,被广泛用于分子标记辅助选择育种实践改良水稻稻瘟病抗性<sup>[28-30]</sup>。近年,笔者分别利用75-1-127和B5为稻瘟病和褐飞虱抗性基因的供体亲本,开展了C815S、帮191S等水稻两用核不育系的抗性基因聚合育种研究<sup>[31]</sup>,育种实践中发现75-1-127的褐飞虱抗性表现突出,并且在

**Bph14**和**Bph15**基因附近开发的DNA标记不能有效区分75-1-127与B5间的多态性。因此,本研究比较了两水稻品系目标基因的DNA序列和褐飞虱抗性,并进一步对源于75-1-127系谱的改良株系进行了**Bph14**和**Bph15**基因的DNA分子标记筛选和褐飞虱抗性鉴定,旨在鉴定出75-1-127中的褐飞虱抗性基因,并利用其创制聚合稻瘟病和褐飞虱抗性基因的新种质。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

受体亲本为水稻光温敏两用核不育系帮191S(B191S),稻瘟病抗性供体亲本75-1-127,褐飞虱抗性供体亲本B5。分别采用CO39和TN1作为稻瘟病和褐飞虱抗性鉴定的阴性对照。所有试验材料种子均由湖南农业大学水稻科学研究所提供。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 材料种植

所有试验材料夏季和冬季分别种植在湖南长沙湖南农业大学试验基地和海南三亚试验基地。改良不育系材料在长沙种植时,当不育系幼穗分化处于IV至VI期,采用20℃~22℃的低温冷水串灌,诱导植株育性转换。在海南种植时,一般将育性敏感期安排在1~2月份,利用自然低温诱导植株恢复育性自交繁种。

#### 1.2.2 DNA 测序

分别提取水稻材料75-1-127和B5的全基因组DNA,委托华智水稻生物技术有限公司进行**Bph14**和**Bph15**基因的序列测定。**Bph14**区间的2个抗性效应基因分别命名为**Bph14-1**和**Bph14-2**<sup>[13]</sup>; **Bph15**编码凝集素类受体蛋白激酶(lectin receptor-like kinase, *OsLecRK*)<sup>[20]</sup>,在**Bph15**定位区间包含3个*OsLecRK*基因,分别命名为*OsLecRK1*、*OsLecRK2*和*OsLecRK3*。根据参考序列设计PCR扩增引物(表1),获取目的基因转录起始位点至转录结束位点产物,并进行PCR产物测序。

#### 1.2.3 植株基因型分析

根据文献[21, 32],筛选在亲本75-1-127和B191S间多态性较好的引物RM7311和RM7178,用于抗稻瘟病基因**Pi9**的筛选;筛选出InDel标记76-2和SSR标记MS5分别用于抗褐飞虱基因**Bph14**和**Bph15**的分析(表2)。PCR采用10 μL反应体系: 10×缓冲液1.0 μL, 5 mmol/L dNTPs 0.2 μL, 2 μmol/L引物1.0 μL, 5 U/μL *Taq*酶0.1 μL, DNA模板(约10

表 1 用于 *Bph14* 和 *Bph15* 基因测序的 PCR 引物

Table 1. PCR primers for *Bph14* and *Bph15* gene sequencing.

目的基因	序列片段	正向引物序列	反向引物序列	PCR 产物
Target gene	Sequence fragment	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	PCR product / bp
<i>Bph14-1</i>	Frag. 1	AGCTGCTCAGACTCTTGCCCTT	TTGCCGCATATATGATGGCA	1384
	Frag. 2	TACACTGCGTACGAAGACCA	AGCTCTTCTCCTTGACCTCA	1422
	Frag. 3	TTGCCTGGAAGGACTGGGTA	ATCCAGACGTTGCTGTAGGCT	1438
	Frag. 4	TATCAGACATTGCGGGAGCT	AGCATAAGGATAGTGGCTAGA	1046
<i>Bph14-2</i>	Frag. 1	TCATTCCAGGCAGCAACTCT	TCGATCTCATGATCCTTGGA	1395
	Frag. 2	ACGCTATATTGAGCAGAAGCA	AGGCAGTTAGCCTAGGACAA	1431
	Frag. 3	TGCAGACTGAAGAAGCTTACCT	TCTCGATGTCATCCAGACGT	1384
	Frag. 4	TGCCCAGGCCTGGTATCCTT	ACAACCTCTCATTGGTCCTG	908
<i>OsLecRK1</i>		GGCCTTGTTGAGTCGTATCCA	ACAATGGTTGCTCTGCTACTC	3729
<i>OsLecRK2</i>		GATCATGTGGTTGTAGAGGAG	AACCGGTTGCCTCGCAGAGA	2861
<i>OsLecRK3</i>		TAGGTAAGCATCAGTGCCCGA	AGCAATGGCTCATCTCCTGT	2543

表 2 用于稻瘟病和褐飞虱抗性基因型分析的分子标记

Table 2. Molecular markers for genotype analysis of rice blast and *Bph* resistance.

引物	目标基因	正向引物序列	反向引物序列
Primer	Target gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
RM7311	<i>Pi9</i>	AGTGGTCGTTGAACTCGGAG	TCGTGGCGCCTTTAATCTC
RM7178	<i>Pi9</i>	TAACCTTCACAGCGAACGTG	CCGTGAGATGGGCTACCTAC
76-2	<i>Bph14</i>	CTGCTGCTGCTCTCGTATTG	CAGGGAAGCTCCAAGAACAG
MS5	<i>Bph15</i>	TTGTGGGTCTCATCTCCTC	TGACAACCTTTGTGCAAGATCAAA

ng/μL)1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 6.7 μL。引物由Invitrogen公司合成,其他试剂购自上海TaKaRa公司。PCR扩增程序如下:95℃下预变性5 min;95℃下30 s;55℃下30 s,72℃下1 min,共35个循环;最后72℃下延伸7 min。PCR产物采用8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染显色后根据带型分析基因型。

1.2.4 稻瘟病抗性鉴定

2018年夏季,在位于湖南浏阳大围山的稻瘟病圃采用大田接种法鉴定稻瘟病抗性。于5月13日播种改良不育系及其受体亲本B191S,将诱发品种CO39播种在试验材料周边,播种后7 d,将提前在温室接种发病的植株秧苗移栽在诱发品种周边。播种后约30 d,CO39秧苗基本枯死,每份材料取15株按国际水稻研究所稻瘟病抗性评价分级标准<sup>[33]</sup>调查发病等级,取平均值为该株系的发病等级。

1.2.5 稻飞虱抗性鉴定

参照黄得润等<sup>[34]</sup>的苗期集团鉴定法鉴定褐飞虱抗性。每一类基因型任选一个株系为样本,S171002、S171008和S171005分别代表*Bph14*单基因系、*Bph15*单基因系以及*Bph14*和*Bph15*聚合系。分别采用TN1和B5为感虫对照和抗虫对照,同时放入受体亲本B191S和供体亲本75-1-127。供试材料统一浸种催芽破胸后播种于小塑料钵(直径15 cm,高5 cm),每株系播3盆,每盆约播种50粒。待秧苗长至

4叶1心时,按每株5~7头2~3龄若虫的标准接种褐飞虱,当感虫对照品种TN1死苗率达到95%时,根据各株系水稻死苗率评定抗性级别<sup>[31,34]</sup>。

1.2.6 农艺性状鉴定

2018年夏季,所有试验材料种植在湖南长沙县江背镇的北大荒垦丰种业湖南育种站试验基地,4月18日播种,5月14日移栽,每个株系田间分小区顺序排列种植,每小区种2行,每行8株,单本栽植,株行距为20 cm×20 cm。齐穗期后每小区随机取3株生长正常的植株,随机选取16~20个单株考查株高、穗长、每穗颖花数、柱头外露率等主要农艺性状。

1.2.7 数据处理

采用Excel 2010进行处理数据,用DPS 9.5进行方差分析。采用Duncan新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 稻瘟病抗性基因 *Pi9* 的回交转移及分子标记辅助选择

2011 年夏季,采用 B191S 为受体亲本,以携带广谱抗稻瘟病基因 *Pi9* 的水稻品系 75-1-127 为供体亲本配制杂交组合,并收获杂交种子。于同年冬季在海南三亚种植 F<sub>1</sub>,与 B191S 回交获得 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 种子。在 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 和 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 世代,采用与 *Pi9* 基因连

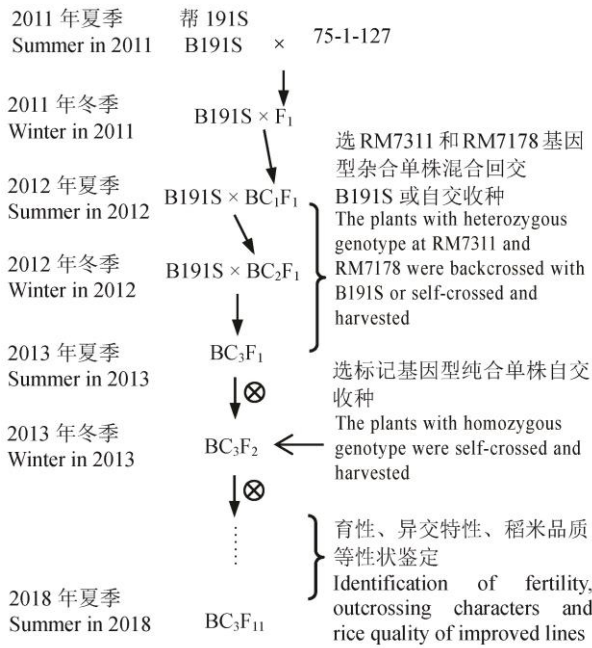


图 1 稻瘟病抗性基因分子标记辅助选择转育程序  
Fig. 1. Procedure of rice blast gene transfer with molecular marker-assisted selection.

锁的标记 RM7311、RM7178 分析各植株的基因型，选择标记基因型杂合、田间农艺性状优良的单株作父本混合授粉 B191S，获得回交种子。在 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 世代，依据上述标准选择单株自交收种获得 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 种子。2013 年冬季，在海南种植 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 植株，采取连锁标记对 *Pi9* 基因进行筛选，在标记基因型纯合单

株中，根据田间农艺性状选择优良单株自交收种。此后连续多代自交繁殖，并逐代针对改良不育系的育性、异交特性、稻米品质等性状进行鉴定和选择。至 2018 年夏季，获得改良的 BC<sub>3</sub>F<sub>11</sub> 植株(图 1)。

2.2 水稻品系 75-1-127 和 B5 中褐飞虱抗性基因 *Bph14* 和 *Bph15* 的序列比较

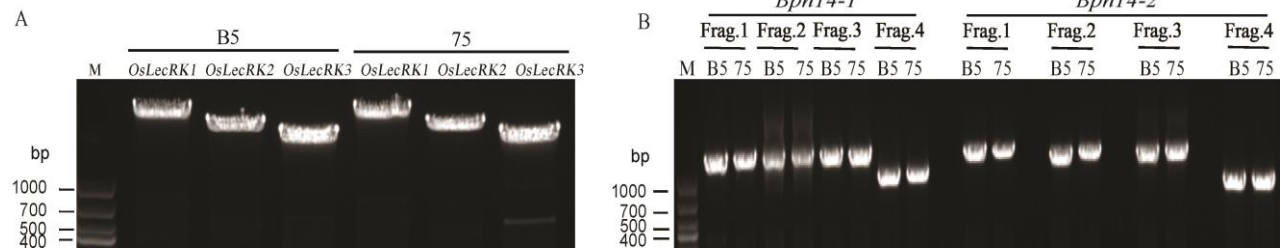
根据参考序列设计引物，对目的基因转录起始位点至结束位点的 PCR 产物进行测序，结果显示，B5 和 75-1-127 两份材料中均含有 *Bph14-1*、*Bph14-2*、*OsLecRK1*、*OsLecRK2* 和 *OsLecRK3*(图 2)，经 BLAST 分析两份材料的基因编码区序列完全一致(表 3)，表明水稻品系 75-1-127 中包含褐飞虱抗性基因 *Bph14* 和 *Bph15*。

2.3 改良系中褐飞虱抗性基因 *Bph14* 和 *Bph15* 的筛查

采用与 *Bph14* 连锁的 InDel 标记 76-2、与 *Bph15* 连锁的 SSR 标记 MS5，分析了 B191S 为受体亲本、75-1-127 为供体亲本的 18 个回交株系的标记基因型，鉴定到 3 个株系为纯合 *Bph14* 标记基因型，6 个株系为纯合 *Bph15* 标记基因型，仅有 2 个株系同时为纯合 *Bph14* 与 *Bph15* 标记基因型，其余 7 个株系 *Bph14* 和 *Bph15* 标记基因型均为非抗性类型。

2.4 改良材料的稻瘟病抗性鉴定

采用田间病圃对基于 B191S 背景、包含不同抗性标记基因型的各株系进行了稻瘟病抗性鉴定，感



75, 75-1-127.  
图 2 *Bph15* 和 *Bph14* 基因的 PCR 产物  
Fig. 2. PCR products of *Bph15* and *Bph14* gene.

表 3 75-1-127 与 B5 中抗褐飞虱基因 *Bph14* 和 *Bph15* 序列相似性分析  
Table 3. Analysis of sequence similarity of *Bph14* and *Bph15* genes between 75-1-127 and B5.

基因片段	GenBank 登录号	序列位置	与 B5 序列相似度
Gene fragment	GenBank accession No.	Location of sequence/bp	Similarity with B5 sequence/%
<i>Bph14-1</i>	FJ941067.1	3043–7659	100
<i>Bph14-2</i>	FJ941068.1	3753–8387	100
<i>OsLecRK1</i>	KF748957	1–2442	100
<i>OsLecRK2</i>	KF748965	1–2436	100
<i>OsLecRK3</i>	KF748973	1–2436	100

序列位置是根据对应基因在 GenBank 中的碱基序列标定。  
The location of sequence is based on the base sequence of the corresponding gene in GenBank.

表 4 B191S 不同基因型改良系的稻瘟病抗性

Table 4. Rice blast resistance of improved lines with different genotypes.

试验材料	株系数	感病级数 <sup>#</sup>
Experimental material	No. of lines	Disease index <sup>#</sup>
CO39	1	8.7±0.6
B191S	1	7.3±0.9
B191S( <i>Pi9</i> )	7	1.6±0.9**
B191S( <i>Pi9</i> + <i>Bph14</i> )	3	1.3±1.0**
B191S( <i>Pi9</i> + <i>Bph15</i> )	6	1.6±0.9**
B191S( <i>Pi9</i> + <i>Bph14</i> + <i>Bph15</i> )	2	1.6±0.9**

<sup>#</sup>感病级数为平均值±标准差( $n$ =株系数×15); \*\*表示改良系与受体亲本 B191S 的稻瘟病感病级数在 1% 水平差异显著。  
<sup>#</sup> Values are mean±SD ( $n$ =number of lines×15); \*\* Means significant difference between improved lines and B191S at 1% level.

表 5 B191S 不同基因型改良系的褐飞虱抗性

Table 5. Brown planthopper resistance of improved lines with different genotypes.

试验材料	<i>Bph</i> 基因型	死苗率 <sup>#</sup>	苗期抗性
Material	<i>Bph</i> genotype	Seedling mortality <sup>#</sup> /%	Seedling resistance
S171002	<i>Bph14</i>	41.8±3.4 B b	中抗 MR
S171005	<i>Bph14</i> , <i>Bph15</i>	8.5±0.1 C c	高抗 HR
S171008	<i>Bph15</i>	11.5±2.6 C c	抗 R
B5	<i>Bph14</i> , <i>Bph15</i>	2.8±1.6 C c	高抗 HR
75-1-127	<i>Bph14</i> , <i>Bph15</i>	5.0±3.5 C c	高抗 HR
B191S		100.0±0.0 A a	感 S
TN1		100.0±0.0 A a	感 S

<sup>#</sup>死苗率为平均值±标准差( $n$ =3); 数字后的大小写字母相同者分别表示在 1% 和 5% 水平上差异不显著。  
<sup>#</sup> Values are mean±SD ( $n$ =3); The same capital and lowercase letters mean no significant difference at 1% and 5% levels, respectively.

病对照 CO39 和受体亲本 B191S 的感病级数分别为 8.7 级和 7.3 级(表 4)。与受体亲本 B191S 相比, 包含单一稻瘟病抗性基因 *Pi9* 的 B191S(*Pi9*)、聚合 *Pi9* 和单一褐飞虱抗性基因的 B191S(*Pi9*+*Bph14*)和 B191S(*Pi9*+*Bph15*)以及聚合 *Pi9* 和 2 个褐飞虱抗性基因的 B191S(*Pi9*+*Bph14*+*Bph15*)感病级数均显著下降, 而 B191S(*Pi9*)、B191S(*Pi9*+*Bph14*)、B191S(*Pi9*+*Bph15*)和 B191S(*Pi9*+*Bph14*+*Bph15*)的稻瘟病抗性未表现出显著差异。

2.5 改良材料的褐飞虱抗性鉴定

B191S 和 TN1 苗期接虫鉴定后死苗率达 100%,

表现为高感; B5 和 75-1-127 苗期抗性级别均为 1 级, 表现为高抗, 两者无显著差异(表 5、图 3)。改良株系中, *Bph14* 单基因系的死苗率为 41.8%, 抗性显著低于供体亲本 75-1-127 或者双基因聚合系; 而 *Bph15* 单基因系或者 *Bph14*/*Bph15* 双基因聚合系的死苗率分别为 11.5% 和 8.5%, 与 75-1-127 死苗率差异不显著。进一步证实 75-1-127 含有褐飞虱抗性基因 *Bph14* 和 *Bph15*, 并且采用与 B5 中褐飞虱抗性基因相同的分子标记辅助选择同样有效。

2.6 改良材料的农艺性状分析

与受体亲本 B191S 相比, 改良株系的播始历期、

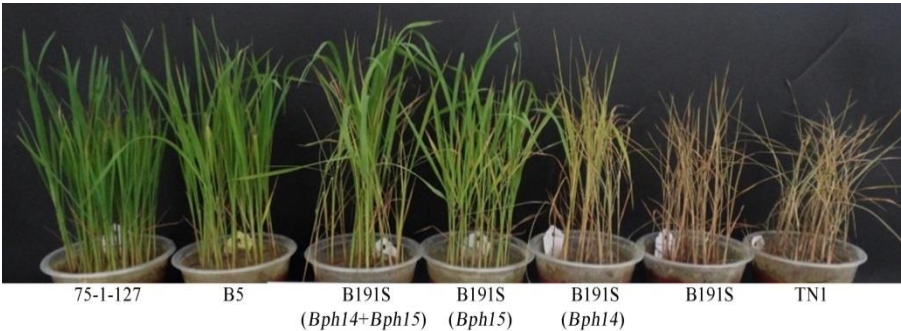


图 3 改良材料的褐飞虱抗性鉴定

Fig. 3. Brown planthopper resistance of the improved lines and the parents.

表 6 改良株系的主要农艺性状

Table 6. Main agronomic traits of the improved lines.

试验材料 Material	播始历期 Duration from seeding to heading /d	株高 Plant height /cm	穗长 Panicle length /cm	每穗颖花数 Spikelets per panicle	双边柱头外露率 Percentage of dual exerted stigma/%	柱头外露 Percentage of total exerted stigma/%
S171002	90	75.9±3.7**	24.4±2.9**	134.5±21.6**	33.5±1.9**	70.6±2.5**
S171005	87	77.1±3.8**	18.3±0.8**	122.6±32.7**	33.2±2.1**	69.0±2.2**
S171008	85	72.1±3.3**	19.0±1.4**	125.5±14.2**	34.4±2.3**	70.2±2.6**
B191S	81	49.6±3.2	14.4±1.3	74.2±12.6	25.6±1.7	63.3±2.4

除播始历期外，其余性状值为平均值±标准差(n=16~20)；\*\*表示改良系与受体亲本 B191S 的相应性状在 1% 水平差异显著。

Trait values are mean±SD except duration from seeding to heading (n=16~20); \*\* means significant difference between improved lines and B191S at 1% level.

株高、穗长、每穗颖花数、双边柱头外露率和柱头外露率等主要农艺性状都发生了较大变化(表6)。受体亲本B191S是一个早稻类型的两系不育系，播始历期仅为81 d，改良不育系播始历期较受体亲本延长4~9 d，可望配制生育期较长的中晚稻组合。伴随着株高的显著增高，穗长、每穗颖花数等性状值也相应增大。值得注意的是，改良株系的柱头外露率显著改善，较受体亲本提高了5.7~7.3个百分点，尤其是双边柱头外露率提高了7.6~8.8个百分点。

3 讨论

本研究通过PCR产物测序证实75-1-127和B5存在相同的*Bph14*和*Bph15*基因序列，褐飞虱苗期集团鉴定结果也表明75-1-127表现出与B5水平相当的褐飞虱抗性，推断75-1-127携带有褐飞虱抗性基因*Bph14*和*Bph15*。采用与水稻品系B5中抗褐飞虱基因*Bph14*与*Bph15*相同的DNA分子标记，对75-1-127回交转育的两系不育系进行DNA分子标记筛选，发现聚合*Bph14*和*Bph15*基因的株系与供体亲本75-1-127、阳性对照品种B5苗期抗性水平基本相当(表5)，进一步证实上述推断是正确的。

因携带稻瘟病广谱抗性基因*Pi9*，75-1-127已被广泛应用于不同生态区域的稻瘟病抗性改良育种中<sup>[28-30]</sup>，本研究的发现将进一步拓宽其育种应用价值。一方面，利用75-1-127作为抗源进行水稻品种抗性改良，可以同时对抗稻瘟病抗性基因*Pi9*和褐飞虱抗性基因*Bph14*和*Bph15*进行筛选，同步改良褐飞虱和稻瘟病抗性，将大大加速育种进程。另一方面，本研究也提示以往采用75-1-127为稻瘟病抗源改良的后代材料中，可采用与*Bph14*和*Bph15*连锁的分子标记进行筛查，可望获得同时兼抗稻瘟病和褐飞虱的新种质。

B5是由两倍体或四倍体CC染色体组的药用野生稻衍生而来<sup>[1]</sup>，后者主要分布在亚洲热带、亚热带和澳大利亚热带地区<sup>[35]</sup>。75-1-127是小粒野生稻与栽培稻远缘杂交、回交构建的渗入系<sup>[27]</sup>，四倍体BBCC染色体组的小粒野生稻分布于菲律宾以及巴布亚新几内亚等亚洲热带地区<sup>[35]</sup>。暗示起源于低纬度热带地区或者CC染色体组的野生稻中可能蕴含丰富的褐飞虱抗性基因，这种类型的水稻种质在褐飞虱抗性基因挖掘研究中值得重视。

参考文献:

[1] Jing S L, Zhao Y, Du B, Chen R Z, Zhu L L, He G C. Genomics of interaction between the brown planthopper and rice. *Curr Opin Insect Sci*, 2017, 19: 82-87.

[2] 蒋春先. 广西兴安地区稻纵卷叶螟和稻飞虱发生规律及迁飞规律的研究. 北京: 中国农业科学院, 2012.

Jiang C S. Occurrence and migration characteristics of rice leaf roller and rice planthopper in Xingan Guangxi. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012. (in Chinese with English abstract)

[3] 王佳妮, 丁波英, 王璐, 王喆, 周国鑫, 姜永根. 外源油菜素甾酮处理水稻对褐飞虱取食和产卵选择性等行为的影响. *植物保护学报*, 2018, 45(5): 998-1004.

Wang J N, Ding B Y, Wang L, Wang Z, Zhou G X, Lou Y G. The effects of exogenous castasterone treatment on rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* behaviors, with special reference to feeding and ovipositing preferences. *J Plant Prot*, 2018, 45(5): 998-1004. (in Chinese with English abstract)

[4] Hu J, Xiao C, He Y Q. Recent progress on the genetics and molecular breeding of brown planthopper resistance in rice. *Rice*, 2016, 9: 30.

[5] Pathak M D, Cheng C H, Fortuno M E. Resistance to *Nephotettix impicticeps* and *Nilaparvata lugens* in varieties of rice. *Nature*, 1969, 223: 502-504.

[6] Cheng X Y, Zhu L L, He G C. Towards understanding of molecular interactions between rice and the brown planthopper. *Mol Plant*, 2013, 6: 621-634.



- [7] Fujita D, Kohli A, Horgan F G. Rice resistance to plant hoppers and leaf hoppers. *Crit Rev Plant Sci*, 2013, 32: 162-191.
- [8] Kobayashi T. Evolving ideas about genetics underlying insect virulence to plant resistance in rice-brown planthopper interactions. *J Insect Physiol*, 2016, 84: 32-39.
- [9] Yang L, Zhang W L. Genetic and biochemical mechanisms of rice resistance to planthopper. *Plant Cell Rep*, 2016, 35(8): 1559-1572.
- [10] Wang Y, Cao L M, Zhang Y X, Cao C X, Liu F, Huang F K, Qiu Y F, Li R B, Lou X J. Map-based cloning and characterization of *BPH29*, a B3 domain-containing recessive gene conferring brown planthopper resistance in rice. *J Exp Bot*, 2015, 66: 6035-6045.
- [11] Jena K K, Kim S M. Current status of brown planthopper (BPH) resistance and genetics. *Rice*, 2010, 3: 161-171.
- [12] Yang L, Li R B, Li Y R, Huang F K, Chen Y Z, Huang S S, Huang L F, Liu C, Ma Z F, Huang D H, Jiang J J. Genetic mapping of *bph20(t)* and *bph21(t)* loci conferring brown planthopper resistance to *Nilaparvata lugens* Stål in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 2011, 183: 161-171.
- [13] Du B, Zhang W L, Liu B F, Hu J, Wei Z, Shi Z Y, He R F, Zhu L L, Chen R Z, Han B, He G C. Identification and characterization of *Bph14*, a gene conferring resistance to brown planthopper in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 22 163-22 168.
- [14] Liu Y Q, Wu H, Chen H, Liu Y L, He J, Kang H Y, Sun Z G, Pan G, Wang Q, Hu J L, Zhou F, Zhou K N, Zheng X M, Ren Y L, Chen L M, Wang Y H, Zhao Z G, Lin Q B, Wu F Q, Zhang X, Guo X P, Cheng X N, Jiang L, Wu C Y, Wang H Y, Wan J M. A gene cluster encoding lectin receptor kinases confers broad-spectrum and durable insect resistance in rice. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 301-305.
- [15] Lv W T, Du B, Shangguan X X, Zhao Y, Pan Y F, Zhu L L, He Y Q, He G C. BAC and RNA sequencing reveal the brown planthopper resistance gene *BPH15* in a recombination cold spot that mediates a unique defense mechanism. *BMC Genom*, 2014, 15: 674.
- [16] Tamura Y, Hattori M, Yoshioka H, Yoshioka M, Takahashi A, Wu J, Sentoku N, Yasui H. Map-based cloning and characterization of a brown planthopper resistance gene *BPH26* from *Oryza sativa* L. ssp. *indica* cultivar ADR52. *Sci Rep*, 2014, 4: 5872.
- [17] Ji H, Kim S R, Kim Y H, Suh J P, Park H M, Sreenivasulu N, Misra G, Kim S M, Hechanova S L, Kim H, Lee G S, Yoon U H, Kim T H, Lim H, Suh S C, Yang J, An G, Jena K K. Map-based cloning and characterization of the *BPH18* gene from wild rice conferring resistance to brown planthopper (BPH) insect pest. *Sci Rep*, 2016, 6: 34376.
- [18] Zhao Y, Huang J, Wang Z Z, Jing S G, Wang Y, Ouyang Y D, Cai B D, Xin X F, Liu X, Zhang C X, Pan Y F, Ma R, Li Q F, Jiang W H, Zeng Y, Shangguan X X, Wang H Y, Du B, Zhu L L, Xu X, Feng Y Q, Yang S, Chen R Z, Zhang Q F, He G C. Allelic diversity in an NLR gene *BPH9* enables rice to combat planthopper variation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 12850-12855.
- [19] Ren J S, Gao F Y, Wu X T, Lu X J, Zeng L H, Lv J Q, Su X W, Luo H, Ren G J. *Bph32*, a novel gene encoding an unknown SCR domain containing protein, confers resistance against the brown planthopper in rice. *Sci Rep*, 2016, 6: 37645.
- [20] Cheng X Y, Wu Y, Guo J P, Du B, Chen R Z, Zhu L L, He G C. A rice lectin receptor-like kinase that is involved in innate immune responses also contributes to seed germination. *Plant J*, 2013, 76: 687-698.
- [21] 李进波, 夏明元, 戚华雄, 何光存, 万丙良, 查中萍. 水稻抗褐飞虱基因 *Bph14* 和 *Bph15* 的分子标记辅助选择. 中国农业科学, 2006, 39(10): 2132-2137.  
Li J B, Xia M Y, Qi H X, He G C, Wan B L, Zha Z P. Marker-assisted selection for brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance genes *Bph14* and *Bph15* in rice. *Sci Agric Sin*, 2006, 39(10): 2132-2137. (in Chinese with English abstract)
- [22] Hu J, Li X, Wu C J, Yang C J, Hua H X, Gao G J, Xiao J H, He Y Q. Pyramiding and evaluation of the brown planthopper resistance genes *Bph14* and *Bph15* in hybrid rice. *Mol Breed*, 2012, 29(1): 61-69.
- [23] 阎勇, 粟学俊, 梁曼玲, 黄凤宽, 陈彩虹. 抗褐飞虱基因 *Bph14* 和 *Bph15* 杂交稻的分子标记辅助选育与抗性评价. 分子植物育种, 2015, 13(7): 1450-1456.  
Yan Y, Su X J, Liang M L, Huang F K, Chen C H. Resistance evaluation and marker-assisted selection (MAS) for brown planthopper resistance genes *Bph14* and *Bph15* in hybrid rice. *Mol Plant Breed*, 2015, 13(7): 1450-1456. (in Chinese with English abstract)
- [24] 蔡之军, 周德银, 高荣村, 王建华, 李金军. 水稻抗褐飞虱基因 *Bph14* 和 *Bph15* 在粳稻育种上的应用. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 257-261.  
Cai Z J, Zhou D Y, Gao R C, Wang J H, Li J J. Application of brown planthopper-resistant genes *Bph14* and *Bph15* in japonica rice breeding. *Jiangsu J Agric Sci*, 2016, 32(2): 257-261. (in Chinese with English abstract)
- [25] 徐晓明, 程攀, 陈龙, 曲姗姗, 阴云伙, 田发春, 彭炳生, 吴帅, 李士明, 周卫营. 应用分子标记辅助选育抗褐飞虱水稻两系不育系. 安徽农业科学, 2016, 44(20): 107-108, 213.  
Xu X M, Cheng P, Chen L, Qu S S, Yin Y H, Tian F C, Peng B S, Wu S, Li T M, Zhou W Y. Breeding TGMS lines with resistance to brown planthopper by marker-assisted selection. *J Anhui Agric Sci*, 2016, 44(20): 107-108, 213. (in Chinese with English abstract)

- [26] 任西明, 向聪, 雷定强, 雷东阳. 利用分子标记辅助选择改良水稻两系不育系 C815S 的褐飞虱抗性研究. 杂交水稻, 2018, 33(3): 54-58.
- Ren X M, Xiang C, Lei D Q, Lei D Y. Improvement of BPH resistance of rice TGMS line C815 through molecular marker-assisted selection. *Hybrid Rice*, 2018, 33(3): 54-58. (in Chinese with English abstract)
- [27] Qu S H, Liu G F, Zhou B, Bellizzi M, Zeng L Y, Dai L Y, Han B, Wang G L. The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice. *Genetics*, 2006, 172(3): 1901-1914.
- [28] 马文清, 裴庆利, 梁云涛, 刘丕庆, 赵开军, 王春连, 林伟, 杨培忠, 于洁. 聚合抗稻瘟病基因 *Pi9* 和抗褐飞虱基因 *Bph18(t)* 选育水稻恢复系. 分子植物育种, 2014, 12(06): 1082-1088.
- Ma W Q, Pei Q L, Liang Y T, Liu P Q, Zhao K J, Wang C L, Lin W, Yang P Z, Yu J. Pyramiding the blast resistant gene *Pi9* and the brown planthopper gene *Bph18(t)* to develop restorer lines in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Plant Breed*, 2014, 12(6): 1082-1088. (in Chinese with English abstract)
- [29] 殷得所, 夏明元, 李进波, 万丙良, 查中萍, 杜雪树, 戚华雄. 抗稻瘟病基因 *Pi9* 的 STS 连锁标记开发及在分子标记辅助育种中的应用. 中国水稻科学, 2011, 25(1): 25-30.
- Yin D S, Xia M Y, Li J B, Wan B L, Zha Z P, Du X S, Qi H X. Development of STS marker linked to rice blast resistance gene *Pi9* in marker-assisted selection breeding. *Chin J Rice Sci*, 2011, 25(1): 25-30. (in Chinese with English abstract)
- [30] Ni D H, Song F S, Ni J L, Zhang A F, Wang C L, Zhao K J, Yang Y C, Wei P C, Yang J B, Li L. Marker-assisted selection of two-line hybrid rice for disease resistance to rice blast and bacterial blight. *Field Crops Res*, 2015, 184: 1-8.
- [31] 曾盖. 利用 MAS 改良水稻两用核不育系的稻瘟病和褐飞虱抗性[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017.
- Zeng G. Improving blast and BPH resistance of dual-purpose genic sterile rice using molecular marker-assisted selection[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2017. (in Chinese with English abstract)
- [32] 曹志, 曾盖, 郝明, 盛浩闻, 叶乃忠, 肖应辉. 利用 MAS 技术改良水稻两用核不育系 C815S 的稻瘟病抗性. 分子植物育种, 2015, 13(6): 1193-1200.
- Cao Z, Zeng G, Hao M, Sheng H W, Ye N Z, Xiao Y H. Improving blast resistance of dual-purpose genic sterile line C815S by using molecular marker-assisted selection. *Mol Plant Breed*, 2015, 13(6): 1193-1200. (in Chinese with English abstract)
- [33] IRRI. Standard Evaluation System for Rice (SES). Los Banos, Philippines: IRRI, 2013: 18.
- [34] 黄得润, 陈洁, 赖凤香, 刘光杰, 庄杰云. 东乡野生稻抗褐飞虱 QTL 分析. 作物学报, 2012, 38(2): 210-214.
- Huang D Y, Chen J, Lai F X, Liu G J, Zhuang J Y. Analysis of quantitative trait loci for resistance to brown planthopper in Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). *Acta Agron Sin*, 2012, 38(2): 210-214. (in Chinese with English abstract)
- [35] 卢宝荣, 葛颂, 桑涛, 陈家宽, 洪德元. 稻属分类的现状及其存在问题. 植物分类学报, 2001(4): 373-388, 394.
- Lu B R, Ge S, Sang T, Chen J K, Hong D Y. The current taxonomy and perplexity of the genus *Oryza* (Poaceae). *Acta Phytotaxon Sin*, 2001(4): 373-388, 394. (in Chinese with English abstract)